

РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ФЕРМЕНТОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ В ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К РАЗВИТИЮ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ

**Н.Н. Чакова¹, С.С. Кругленко¹, Е.П. Михаленко¹, Э.В. Крупнова¹,
Н.В. Чеботарева,¹ Н.В. Микульчик,² Л.М. Беяева²**

¹ГУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь

²УЗ «4-ая городская детская клиническая больница», Минск, Республика Беларусь

Введение. По заключению экспертов ВОЗ, к числу наиболее распространенных хронических заболеваний дыхательных путей человека относится бронхиальная астма (БА). Среди взрослого населения распространенность БА превышает 5%, среди детей ее удельный вес составляет более 10%. За последние три десятка лет распространенность БА возросла более чем на 32%. Данное заболевание относится к мультифакторной патологии, и в его развитии большая роль отводится наследственной (генетической) предрасположенности [1,2,9].

С позиции изучения вклада генетической компоненты в развитие мультифакторных болезней особую актуальность приобретает исследование системы генов ферментов биотрансформации

ксенобиотиков (ФБК), поскольку ферментами этой системы осуществляется метаболизм большинства разнообразных по химической структуре экзогенных молекул. ФБК также активно участвует и в метаболизме эндогенных субстратов – интермедиатов процессов сенсибилизации, воспаления и бронхоконстрикции. Функционирование системы ФБК представляет собой сформировавшийся в процессе эволюции механизм адаптации организма к воздействию экзогенных и эндогенных веществ. Предполагается, что генетически детерминированные различия в скорости деградации различных субстратов ферментами метаболизма могут лежать в основе неодинаковой восприимчивости к ряду заболеваний, в том числе и к БА [1,2,3].

В связи с вышеизложенным, **целью** данной работы является изучение ассоциации полиморфизма генов ферментов детоксикации глутатион-S-трансфераз (GST) и N-ацетилтрансфераз (NAT) с предрасположенностью к развитию бронхиальной астмы у детей.

Материалы и методы исследования. Обследовано 175 детей в возрасте от 3 до 18 лет, страдающих atopической бронхиальной астмой, находившихся на лечении в УЗ «4-ая городская детская клиническая больница» в 2009-2010 г.г. В контрольную выборку вошли 120 человек соответствующего возраста без признаков аллергической патологии.

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови проводили стандартным способом с использованием фенол-хлороформной экстракции [4].

Исследование полиморфизма *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* и *NAT2* проводилось с помощью мультиплексной ПЦР и ПЦР-ПДРФ анализа согласно методикам, описанным ранее [5,6].

Статистическая обработка материала проводилась с использованием пакета прикладных программ “Statistica for Windows 6.0”. Об ассоциации генотипов с предрасположенностью к БА судили по величине отношения шансов (odds ratio, OR). OR рассчитывали по стандартной формуле $OR = (A/B)/(C/D)$, где А и В – количество больных, имеющих и не имеющих мутантный генотип, соответственно, и С и D – количество человек в контрольной группе, имеющих и не имеющих мутантный генотип. OR указан с 95%-ным доверительным интервалом [7].

Результаты исследования и их обсуждение. Ключевыми ферментами детоксикации (вторая фаза биотрансформации) являются глутатион-S-трансферазы (GST) и N-ацетилтрансферазы (NAT). Наиболее изученными из GST являются ферменты класса μ (*GSTM1*), класса θ (*GSTT1*) и класса π (*GSTP1*). Полиморфизм *GSTM1* и *GSTT1* обусловлен наличием протяженной делеции в кодирующей области («нулевой генотип»), в результате чего синтез соответствующего белкового продукта не происходит. Наличие «нулевого генотипа» хотя бы по одному из этих генов (*GSTM1* или *GSTT1*) связывают с увеличением риска развития мультифакторных заболеваний [2,9]. Полиморфизм *A313G* в 5 экзоне гена *GSTP1* проявляется заменой изолейцина 105 на валин (Ile105Val). Watson et al. показал, что носители аллеля G (Ile/Val и Val/Val) характеризуются сниженной конъюгационной активностью фермента по сравнению с индивидуумами, имеющими генотип AA (Ile/Ile) [8].

Данные анализа ассоциации полиморфных вариантов *GSTT1*, *GSTM1* и *GSTP1* генов с подверженностью к БА представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Ассоциация генотипов *GSTT1*, *GSTM1* и *GSTP1* с риском развития бронхиальной астмы

Генотип	Пациенты с БА		Контрольная группа		OR (95% CI)
	n	%	n	%	
<i>GSTM1</i> -	75	42,9	56	46,7	0,86 (0,54-1,37)
<i>GSTM1</i> +	100	57,1	64	53,3	1,17 (0,73-1,86)
<i>GSTT1</i> -	37	21,1	13	10,8	2,21 (1,12-4,22)*
<i>GSTT1</i> +	138	78,9	107	89,2	0,45 (0,24-0,91)*
<i>GSTP1</i> (<i>A313G</i>)					
313AA	86	48,9	64	53,3	0,85 (0,53-1,35)
313GA	66	37,5	49	40,9	0,88 (0,55-1,41)
313GG	24	13,6	7	5,8	2,57 (1,04-5,74)*

Примечание –* $p < 0,05$, p – уровень значимости различий по критерию χ^2 в сравнении с аналогичными группами в контроле

Полученные данные позволяют предположить, что наличие генотипа *GSTT1*(+) является фактором устойчивости к развитию БА (OR=0,45; 95%CI: 0,24–0,91), а генотипа *GSTT1*(-) – фактором риска (OR=2,21; 95%CI: 1,12–4,22). Российские исследователи также показали, что «нулевой» генотип гена *GSTT1* в группе пациентов с БА встречается достоверно чаще, чем в контроле [6,9].

В таблице 2 представлены также результаты исследования зависимости развития БА от генотипа *GSTP1*. Достоверная рисковая значимость была обнаружена для носителей генотипа *313GG* (OR=2,57; 95%CI: 1,04–5,74). Возможно, измененная активность фермента *GSTP1* у носители аллеля G приводит к повышенному уровню гидрофобных аддуктов в тканях легких по сравнению с индивидуумами, имеющими генотип AA [8].

Для более полного представления о формировании фенотипа конъюгации ксенобиотиков с глутатионом *in vivo*, мы оценили частоты комбинаций генотипов у детей с БА и в контрольной группе (таблица 2).

Таблица 2 – Оценка связи комбинаций генотипов *GSTP1/GSTM1/GSTT1* с предрасположенностью к развитию БА

Комбинация генотипов	Контрольная группа		Пациенты с БА		OR (95%CI)
	п	%	п	%	
<i>313AA/GSTT1</i> (+)/ <i>GSTM1</i> (+)	26	21,6	38	21,7	1,00 (0,57-1,75)
<i>313AA/GSTT1</i> (+)/ <i>GSTM1</i> (-)	30	25,0	27	15,4	0,55 (0,31-0,98)*
<i>313AA/GSTT1</i> (-)/ <i>GSTM1</i> (+)	3	2,5	13	7,4	3,13 (0,84-9,25)
<i>313AA/GSTT1</i> (-)/ <i>GSTM1</i> (-)	5	4,2	8	4,6	1,10 (0,36-3,20)
<i>313GA/GSTT1</i> (+)/ <i>GSTM1</i> (+)	27	22,5	33	18,9	0,80 (0,45-1,41)
<i>313GA/GSTT1</i> (+)/ <i>GSTM1</i> (-)	18	15,0	24	13,7	0,90 (0,47-1,92)
<i>313GA/GSTT1</i> (-)/ <i>GSTM1</i> (+)	2	1,7	6	3,4	2,09 (0,41-7,96)
<i>313GA/GSTT1</i> (-)/ <i>GSTM1</i> (-)	2	1,7	3	1,7	1,03 (0,19-4,96)
<i>313GG/GSTT1</i> (+)/ <i>GSTM1</i> (+)	5	4,2	8	4,6	1,10 (0,36-3,20)
<i>313GG/GSTT1</i> (+)/ <i>GSTM1</i> (-)	1	0,8	8	4,6	5,70 (0,70-23,3)
<i>313GG/GSTT1</i> (-)/ <i>GSTM1</i> (+)	1	0,8	2	1,1	1,38 (0,15-8,81)
<i>313GG/GSTT1</i> (-)/ <i>GSTM1</i> (-)	0	0,0	5	2,9	-

Примечание – * $p < 0.05$, p – уровень значимости различий по критерию χ^2 в сравнении с аналогичными группами в контроле

В результате проведенного анализа было выявлено, что комбинация генотипов *313AA/GSTT1*(+)/*GSTM1*(-) является фактором устойчивости к развитию БА (OR=0,55; 95%CI: 0,31-0,98). Следует отметить, что комбинация генотипов *313GG/GSTT1*(-)/*GSTM1*(-) встречалась только у больных бронхиальной астмой, что указывает на то, что эта комбинация является наиболее неблагоприятной. Баранов и др. также установили, что сочетание «функционально ослабленных» генотипов генов *GSTP1*, *GSTT1* и *GSTM1* является неблагоприятным для прогноза БА [10].

Еще одним ферментом детоксикации, роль генетического полиморфизма которого широко изучается в этиологии мультифакторных заболеваний, является NAT2. Аллельные варианты NAT2 связаны в основном с точечными мутациями, большинство из которых нарушают каталитическую функцию и/или стабильность фермента. Это приводит к снижению скорости ацетилирования в организме, в результате чего снижается эффективность инактивации токсических метаболитов. Результаты некоторых работ свидетельствуют о наличии ассоциаций между статусом ацетилирования NAT2 и такими заболеваниями, как контактный аллергический дерматит [12], бронхиальная астма [2].

Обследованных индивидуумов делили на «быстрые» и «медленные» ацетиляторы по результатам генотипирования трех сайтов NAT2 (*C481T*, *G590A*, *G857A*) в соответствии с принятой классификацией (таблица 3) [11].

Таблица 3 – Анализ распределения частоты встречаемости «быстрых» и «медленных» ацетилаторов с риском развития БА

Генотипы	Пациенты с БА		Контрольная группа		OR (95%CI)
	п	%	п	%	
быстрые ацетилаторы (всего), из них:	82	46,9	50	41,7	1,23 (0,77-1,97)
<i>481CC/ 590GG/ 857GG</i>	12	6,9	6	5,0	1,40 (0,51-3,58)
<i>481CT/ 590GG/ 857GG</i>	35	20,0	30	25,0	0,75 (0,43-1,30)
<i>481CC/ 590GA/ 857GG</i>	34	19,4	12	10,0	2,17 (1,06-4,23)*
<i>481CC/ 590GG/ 857GA</i>	1	0,6	2	1,7	0,34 (0,05-3,13)
медленные ацетилаторы(всего), из них:	93	53,1	70	58,3	0,81 (0,51-1,30)
<i>481CC/ 590GA/ 857GA</i>	5	2,9	2	1,7	1,74 (0,34-6,94)
<i>481CT/ 590GA/ 857GG</i>	47	26,8	29	24,3	1,15 (0,67-1,95)
<i>481CT/ 590GG/ 857GA</i>	0	-	3	2,5	-
<i>481CT/ 590GA/ 857GA</i>	1	0,6	6	5,0	0,11 (0,03-0,91)*
<i>481TT</i>	30	17,1	16	13,3	1,34 (0,69-2,54)
<i>590AA</i>	10	5,7	14	11,7	0,46 (0,20-1,07)

Примечание –* $p < 0.05$, p – уровень значимости различий по критерию χ^2 в сравнении с аналогичными группами в контроле

Сравнительный анализ частоты встречаемости различных гаплотипов между выборкой больных БА и контрольной группой показал, что носительство гаплотипа *481CC/590GA/857GG NAT2* является фактором риска развития БА (OR=2,17; 95%CI: 1,06 – 4,23), а гаплотип *481CT/590GA/857GA NAT2* обладает защитным эффектом (OR=0,11; 95%CI: 0,03 – 0,91). В исследованиях Ляховича и др. было показано, что наличие мутантного аллеля *481T* является фактором устойчивости к развитию БА, а двойная гетерозигота *C481T/G590A* является также маркером устойчивости и к атопическому дерматиту [2].

Закключение. Выявление генетических маркеров, информативных в отношении мультифакторной патологии, в том числе и заболеваний органов дыхания, дает возможность распознавать индивидов со склонностью к развитию этих заболеваний еще в раннем детском возрасте и проводить целенаправленную профилактику, осуществлять индивидуальный подход при выборе методов лечения, а также правильно сориентировать ребенка при выборе будущей профессии.

Знание индивидуальных генетических особенностей метаболизма позволит каждому человеку успешно оптимизировать состояние своего здоровья. А медики, опираясь на генетические исследования, могут разрабатывать эффективные индивидуальные программы профилактики и лечения мультифакторных заболеваний на основе классических методов лечения.

Литература:

1. Ассоциация полиморфных ферментов биотрансформации ксенобиотиков с предрасположенностью к бронхиальной астме у детей с наследственной отягощенностью и без таковой / В.А. Вавилин [и др.] // Генетика. – 2002. – Т. 38. – № 4. – С. 539–545.
2. Роль ферментов биотрансформации ксенобиотиков в предрасположенности к бронхиальной астме и формировании особенностей ее клинического фенотипа / В.В. Ляхович [и др.] // Вестник РАМН. – 2000. – № 12. – С. 36–41.
3. Nebert, D.W. Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? / D.W. Nebert // Am. J. Hum. Genet. – 1997. – № 60. – P. 265–271.
4. Mathew, C.C. The isolation of high molecular weight eucaryotic DNA / C.C. Mathew // in Walker JMNJ (ed): methods in molecular biology. – Clifton: Human Press, 1984. – Vol. 2. – P.31–34.
5. Полиморфизм GST-генов и цитогенетические изменения в ткани легкого больных раком легкого / Н.Н. Чакова [и др.] // Цитология и генетика. – 2009. – Т. 43, № 1. – С. 48–53.
6. Генетический полиморфизм ферментов метаболизма лекарственных средств (CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9, GST, NAT2 и MDR1) у жителей Беларуси / Н.Н. Чакова [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. – 2009. – Т. 10. – С. 161-169.
7. Флетчер, Р. Клиническая эпидемиология: Основы доказательной медицины / Р. Флетчер, С. Флетчер, Э. Вагнер. – М.: Медиа Сфера, 2004. – 347 с.